
••• МІКРОБІОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY •••

УДК: 616.093-098:616.2

Вивчення антилізоцимної активності бактерій родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*, виділених від пацієнтів із захворюваннями органів дихання
О.В.Менкус

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова АМН України» (Харків, Україна)
Olena.menkus@gmail.com

Досліджена антилізоцимна активність умовно-патогенної мікрофлори, ізольованої від пацієнтів з захворюваннями органів дихання. Більш високі значення антилізоцимної активності встановлено у штамів *S. pyogenes*, *S. aureus*, виділених переважно від хворих з тяжким перебігом захворювання. Це свідчить про селективний відбір штамів, які мають більш високу антилізоцимну активність, необхідну для тривалої персистенції в еконішах.

Ключові слова: антилізоцимна активність, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*

Изучение антилизоцимной активности бактерий родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*, выделенных от пациентов с заболеваниями органов дыхания
Е.В.Менкус

Исследована антилизоцимная активность условно-патогенной микрофлоры, изолированной от пациентов с заболеваниями органов дыхания. Более высокие значения антилизоцимной активности установлены у штаммов *S. pyogenes*, *S. aureus*, выделенных преимущественно от больных с тяжелым течением заболевания. Это свидетельствует о селективном отборе штаммов, имеющих более высокую антилизоцимную активность, необходимую для длительной персистенции в эконисах.

Ключевые слова: антилизоцимная активность, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*

The study of antilysozymic activity of bacteria of *Streptococcus* and *Staphylococcus* genera in patients with respiratory diseases
O.V.Menkus

Antilysozymic activity of relatively pathogenic microflora isolated from patients with diseases of respiratory organs has been studied. Higher values of antilysozymic activity have been observed in stocks of *S. pyogenes*, *S. aureus* which were isolated mainly from patients with severe diseases. This is an evidence of selection of stocks with higher antilysozymic activity which is necessary for prolonged persistence in econiches.

Key words: antilysozymic activity, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*

Вступ

Хвороби органів дихання займають одне з перших місць в загальній структурі захворюваності населення. Майже кожна людина, а особливо діти, страждають на захворювання дихальних шляхів щорічно. Дана проблема ускладнюється зниженням імунітету, розвитком хронічного імунодефіциту та погіршенням екологічної ситуації навколишнього середовища. Незважаючи на удосконалення профілактичних та лікувальних методів, а також появи нових ефективних лікарських препаратів, інфекції дихальних шляхів продовжують залишатися важливою проблемою сучасної медицини (Андреева, Стецюк, 2009; Єгошина та ін., 2010).

Захворювання органів дихання різняться тривалістю перебігу та часто ускладнюються приєднанням вторинної інфекції. Тривале персистування бактерій в макроорганізмі, а також перехід

інфекційного процесу в хронічну форму забезпечують механізми персистенції мікроорганізмів на слизових оболонках респіраторного тракту (Коленчукова и др., 2008). Здатність умовно-патогенних бактерій ініціювати розвиток запального процесу пов'язана з комплексом їх біологічних властивостей, спрямованих на інактивацію факторів неспецифічного та специфічного антиінфекційного захисту макроорганізму, таких як антилізоцимна (АЛА), антикомплементарна та інші активності (Бухарин, 1999; Костюкова, 2001).

Лізоцим є одним з найважливіших факторів природної резистентності хазяїна, який чинить антимікробну дію по відношенню до широкого кола мікроорганізмів за рахунок катіонної природи білка та, меншою мірою, мурамідазної активності. Як відомо, при інфекційних процесах має місце зниження лізоцимного параметру організму, що пояснюється здібністю збудника інактивувати мурамідазу. У процесі еволюції у бактерій та грибів сформувалися різноманітні механізми інгібіторної дії щодо лізоциму, які визначаються як антилізоцимна активність мікроорганізмів (Бухарин, Усвяцов, 1981; Бухарин, Валышев, 2006; Гриценко, 1996). Наявність у бактерій АЛА забезпечує їм селективні переваги росту і розмноження на слизовій оболонці носоглотки та інших органів (Дерябин и др., 1996; Четвертнова, 2008). Доведено, що АЛА є конститутивним фактором, який специфічно взаємодіє з лізоцимом та визначає тривалість виживання їх на етапах транслокації та персистенції. З ніш природного перебування, шляхом транслокації мікроорганізми потрапляють в фагоцити регіонарних лімфатичних вузлів, де проліферують і потім гематогенним шляхом розносяться в різні органи, викликаючи ендogenousні інфекції. Визначення таких мікроорганізмів та вивчення їх властивостей, що сприяють адгезії, інвазії та персистенції на слизових оболонках дихальних шляхів, допомагають розширити уявлення про перебіг запального процесу та допомогти в наданні адекватного лікування хронічних легеневих захворювань (Лук'яненко та ін., 2010; Пилькевич, 2006).

Метою нашого дослідження було вивчення АЛА у бактерій родів *Staphylococcus* та *Streptococcus*, ізольованих від пацієнтів із захворюваннями органів дихання.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктами дослідження були 315 штамів бактерій родів *Staphylococcus* та *Streptococcus*, з яких 175 штамів вилучено від хворих з гострими та хронічними запальними процесами дихальних шляхів (1 група пацієнтів, 90 осіб): 64 штами *Staphylococcus aureus*, 25 штамів – *Staphylococcus epidermidis*, 35 штамів – *Streptococcus pyogenes*, 15 штамів – *Streptococcus pneumoniae*, 15 штамів – *Streptococcus mitis*, 21 штама – *Streptococcus anginosus*. Ще 140 штамів були виділені від осіб групи зрівняння (2 група, 85 осіб): 27 штамів – *S. aureus*, 38 штамів – *S. epidermidis*, 25 штамів – *S. pyogenes*, 10 штамів – *S. pneumoniae*, 25 штамів – *S. mitis*, 15 штамів – *S. anginosus*. Штами виділені зі слизової оболонки носових ходів та задньої стінки глотки. Усі пацієнти 1 групи були обстежені в стадії загострення захворювання, мазок зі слизової оболонки носоглотки був взятий до початку антибактеріальної терапії. Усі використані для досліджень культури за своїми морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями були характерними представниками родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*. Вилучення та ідентифікацію мікроорганізмів проводили загальноприйнятими методами у відповідності до нормативних документів (Приказ МЗ ССРСР №535, 1985; Бирюкова, Манина, 2007).

АЛА мікроорганізмів визначали за методикою О.В.Бухаріна з використанням тест-культури *Micrococcus luteus* var. *lysoderiticus* (штам №2665 ГІСК ім. Л.А.Тарасевича). Кількісну оцінку антилізоцимної активності штаму проводили за максимальною концентрацією лізоциму в середовищі, яка інактивувалась даним штамом (Бухарин и др., 1984).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2003 та пакету прикладних програм для обробки медико-біологічної інформації Statistica – 6.0. Для характеристики показників антилізоцимної активності використовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) і його стандартного відхилення (σ). Оцінку достовірності різниці між порівнюваними показниками визначали за допомогою критерію Стьюдента (Гельман, 2002).

Результати та обговорення

У пацієнтів 1 групи виділено: *Streptococcus* spp. у 82% хворих (*S. pyogenes* – 48,9%; *S. pneumoniae* – 14,1%; *S. anginosus* – 21,7%; *S. mitis* – 15,2%). Бактерії виділено у кількості: *S. pyogenes* від 3,0 Іг КУО/мл до 7,0 Іг КУО/мл, *S. pneumoniae* – від 4,0 Іг КУО/мл до 7,0 Іг КУО/мл, *S. anginosus* – від 3,0 Іг КУО/мл до 5,0 Іг КУО/мл, *S. mitis* – від 2,0 Іг КУО/мл до 5,0 Іг КУО/мл.

Staphylococcus spp. виділено у 88% хворих (*S. aureus* – 72,7%; *S. epidermidis* – 27,2%) у кількості: *S. aureus* – від 4,0 Іг КУО/мл до 8,0 Іг КУО/мл, *S. epidermidis* – від 2,0 Іг КУО/мл до 6,0 Іг КУО/мл. Також в ході дослідження виявлено, що бактерії висівались у вигляді монокультури та асоціацій. Ізольовані *Streptococcus spp.* та *Staphylococcus spp.* у 88,5% випадках зустрічались в асоціаціях.

У 65% пацієнтів 2 групи виділено *Streptococcus spp.* (*S. pyogenes* – 34,3%; *S. anginosus* – 22,4%; *S. mitis* – 32,8%, *S. pneumoniae* – 10,4%). Бактерії виділено у кількості: *S. pyogenes* – від 3,0 Іг КУО/мл до 5,0 Іг КУО/мл; *S. pneumoniae* – від 2,0 Іг КУО/мл до 3,0 Іг КУО/мл; *S. anginosus* – від 2,0 Іг КУО/мл до 4,0 Іг КУО/мл; *S. mitis* – від 2,0 Іг КУО/мл до 3,0 Іг КУО/мл. У 83,3% хворих виділено представників роду *Staphylococcus* (*S. aureus* – 29,0%; *S. epidermidis* – 71,0%) у кількості: *S. aureus* – від 2,0 Іг КУО/мл до 5,0 Іг КУО/мл, *S. epidermidis* – від 2,0 Іг КУО/мл до 4,0 Іг КУО/мл. Виділені *Streptococcus spp.* та *Staphylococcus spp.* у 76,5% випадках зустрічались в асоціаціях.

В результаті проведеного нами дослідження встановлено, що здатність інактивувати лізоцим була притаманна більшості протестованих штамів. Разом з тим, частота прояву АПА в межах конкретного виду патогену суттєво варіювала. Так, в 1 групі пацієнтів із захворюваннями органів дихання АПА була виявлена у 89,9% випадків. При цьому ізоляти *S. aureus* у 93,7% випадків, а *S. epidermidis* – у 80,0% мали АПА з середнім рівнем 4,8±0,4 та 2,8±0,2 мкг/мл відповідно. В 2 групі пацієнтів АПА була виявлена лише у 60,0%. При цьому ізоляти *S. aureus* мали АПА у 66,7%, тоді як у *S. epidermidis* – у 55,3% випадків з середнім рівнем – 3,1±0,2 та 2,1±0,2 відповідно (табл. 1).

Таблиця 1.

Антилізоцимна активність бактерій родів *Streptococcus* та *Staphylococcus*

Вид бактерій	Частота АПА, %		АПА, мкг/мл	
	1 група	2 група	1 група	2 група
<i>S. aureus</i>	93,7*	66,7	4,8±0,4*	3,1 ±0,2
<i>S. epidermidis</i>	80,0*	55,3	2,8±0,2*	2,1± 0,2
<i>S. pyogenes</i>	94,3*	68,0	3,8±0,3	3,2±0,4
<i>S. pneumoniae</i>	80,0	60,0	3,1±0,2*	2,2±0,3
<i>S. mitis</i>	66,6	60,5	2,2±0,3	1,8±0,2
<i>S. anginosus</i>	71,4	73,3	2,8±0,3*	2,0±0,2

Примітка: * – достовірність ($p < 0,05$).

При аналізі експресивності АПА стафілококів було встановлено, що кількість культур, виділених від хворих на захворювання органів дихання з рівнем АПА до 5 мкг/мл, склала 39,9%. У пацієнтів 1 групи переважали стафілококи з АПА від 5 мкг/мл – їх питома вага склала 60,1%, тоді як у штамів, виділених від 2 групи обстежених, дану активність не проявив жодний із штамів. У пацієнтів 2 групи 51,3% штамів мали активність 3–4 мкг/мл. Найбільш виражена АПА була зареєстрована у штамів *S. aureus*, переважно виділених від 1 групи пацієнтів. Отримані результати свідчать про найбільший патогенний потенціал *S. aureus* у випадках даних видів захворювань.

В 1 групі пацієнтів серед стрептококів АПА у 94,3% випадків була виявлена тільки у штамів *S. pyogenes*, середній рівень склав 3,8±0,3 мкг/мл. У інших стрептококів, а саме *S. anginosus*, *S. pneumoniae* та *S. mitis*, частота АПА коливалася від 66,6–80 % та дорівнювала 2,8±0,3 мкг/мл; 3,1±0,2 мкг/мл; 2,2±0,3 мкг/мл відповідно. В 2 групі обстежених АПА виявлена тільки у 68,0% штамів *S. pyogenes* та в середньому дорівнювала 3,2±0,4 мкг/мл. У *S. anginosus*, *S. pneumoniae*, *S. mitis* частота АПА коливалася в межах від 60,0–73,3 % та в середньому дорівнювала: 2,2±0,3 мкг/мл; 2,0±0,2 мкг/мл; 1,8±0,2 мкг/мл відповідно.

При аналізі експресивності АПА було встановлено, що діапазон прояву антилізоцимної активності у стрептококів складав від 1 до 4 мкг/мл. У пацієнтів 1 групи питома вага стрептококів з рівнем АПА 4 мкг/мл склала 37,6%, тоді як у штамів, виділених від 2 групи обстежених, питома вага штамів з аналогічним рівнем персистентної ознаки склала всього 8,3%. Найменша кількість антилізоцимактивних штамів була виявлена серед *S. mitis*. Найбільш виразну АПА мали штами *S. pyogenes* та *S. pneumoniae*, також переважно виділених від пацієнтів 1 групи.

Частота прояву АПА у стрептококів корелювала з її інтенсивністю для конкретного виду. Так, інтенсивність АПА *S. pyogenes* в порівнянні з *S. mitis* була нижчою майже в 1,7 разів, для *S. anginosus* – в 1,3 рази.

Таким чином, встановлено, що більшість досліджуваних нами штамів мають АЛА з видоспецифічною частотою прояву та інтенсивністю. Найбільш виражену АЛА проявляють *S. aureus*, *S. pyogenes* та *S. pneumoniae*. Виявлені достовірні розбіжності в частоті прояву та рівні вираженості АЛА мікроорганізмів у пацієнтів із захворюваннями органів дихання та осіб групи зрівняння. Отримані дані підтверджують участь факторів персистенції (АЛА) в механізмах хронізації захворювань дихальних шляхів.

Штами стафілококів та стрептококів, які були вилучені від пацієнтів із захворюваннями органів дихання та виділені у вигляді асоціацій, частіше характеризувалися антилізоцимною активністю та мали більш високі показники, ніж штами, виділені у вигляді монокультур. Присутність умовно-патогенних мікроорганізмів з вираженими персистентними характеристиками в зоні ураження може розглядатися як пусковий момент в загостренні захворювань органів дихання, тим самим підтримуючи їх хронічний перебіг.

Список літератури

- Андреева И.В., Стецюк О.У. Инфекции дыхательных путей // Болезни и возбудители. – 2009. – Т.11, №2. – С. 143–151. /Andreyeva I.V., Stetsyuk O.Yu. Infektsii dykhatelnykh putey // Bolezni i vzbuditeli. – 2009. – Т.11, №2. – С. 143–151./
- Бирюкова С.В., Манина Ж.Н. Микробиологическая диагностика стрептококковой, энтерококковой и пептострептококковой инфекций. Методические рекомендации для врачей и интернов по специальности «Бактериология». – Харьков, 2007. – 69с. /Biryukova S.V., Manina Zh.N. Mikrobiologicheskaya diagnostika streptokokkovoy, enterokokkovoy i peptostreptokokkovoy infektsii. Metodicheskiye rekomendatsii dlya vrachey i internov po spetsialnosti «Bakteriologiya». – Kharkov, 2007. – 69s./
- Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я. Лизоцимная активность микроорганизмов // Антибиотики. – 1981. – №10. – С. 782–793. /Bukharin O.V., Usvyatsov B.Ya. Lizotsymnaya aktivnost mikroorganizmov / Antibiotiki. – 1981. – №10. – С. 782–793./
- Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Малышкин А.П. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов // Журн. микробиологии. – 1984. – №27. – С. 27–28. /Bukharin O.V., Usvyatsov B.Ya., Malyshekin A.P. Metod opredeleniya antilizotsymnoy aktivnosti mikroorganizmov // Zhurnal mikrobiologii. – 1984. – №27. – С. 27–28./
- Бухарин О.В., Вальшев А.В. Микробные ингибиторы лизоцима // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – №4. – С. 8–13. /Bukharin O.V., Valyshev A.V. Mikrobnyye inhibitory lizotsyma // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. – 2006. – №4. – С. 8–13./
- Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. – Медицина, 1999. – 368с. /Bukharin O.V. Persistentsiya patogennykh bakteriy. – Meditsina, 1999. – 368s./
- Гельман В.Я. Медицинская информатика. Практикум. – Санкт-Петербург: Питер, 2002. – 480с. /Gelman V.Ya. Meditsynskaya informatika. Praktikum. – Sankt-Peterburg: Piter, 2002. – 480s./
- Гриценко В.А. Анализ взаимосвязи антилизоцимной активности и репродуктивной функции у эшерихий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1996. – №4. – С. 67–71. /Gritsenko V.A. Analiz vzaimosvyazi antilizotsymnoy aktivnosti i reproduktivnoy funktsii u esherikhiy // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. – 1996. – №4. – С. 67–71./
- Дерябин Д.Г., Курлаев П.П., Брудастов Ю.А. Роль персистентных характеристик возбудителя в определении затяжного течения гнойно-воспалительного процесса // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1996. – №3. – С. 74–77. /Deryabin D.G., Kurlayev P.P., Brudastov Yu.A. Rol' persistentnykh kharakteristik vzbuditelya v opredelenii zatyazhnogo techeniya gnoyno-vozpалitel'nogo protsessa // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. – 1996. – №3. – С. 74–77./
- Єгошина В.О., Коляда О.М., Бруснік С.В. Показники резистентності у хворих на пневмонію різної етіології // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – №4. – С. 48–52. /Yegoshyna V.O., Kolyada V.M., Brusnik S.V. Pokaznyky rezystentnosti u khvorykh na pnevmoniyu riznoi etiologii // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – №4. – С. 48–52./
- Коленчукова О.А., Игнатова И.А., Смирнова С.В. Особенности микрофлоры слизистой оболочки носа у больных аллергическим риносинуситом // Вестник оториноларингологии. – 2008. – №5. – С. 33–35. /Kolenchukova O.A., Ignatova I.A., Smirnova S.V. Osobnosti mikroflory slizistoy obolochki nosa u bolnykh alergicheskim rinosinusitom // Vestnik otorinolaringologii. – 2008. – №5. – С. 33–35./
- Костюкова Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути её предотвращения // Журн. микробиологии. – 2001. – №9. – С. 103–109. /Kostyukova N.N. Nachalnyy etap infektsionnogo protsessa – kolonizatsiya i puti yeye predotvrashcheniya // Zhurnal mikrobiologii. – 2001. – №9. – С. 103–109./
- Лук'яненко Т.В., Осолодченко Т.П., Кузьмін В.Н. Антилізоцимна та лізоцимна активність бактерій роду *Streptococcus sp.* і *Streptococcus sp.*, ізольованих від хворих на алкогольний делірій // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – №4. – С. 14–18. /Lukyanenko T.V., Osolodchenko T.P., Kuzminov V.N. Antylisotsymna aktyvnist bakteriy rodu *Streptococcus sp.* i *Streptococcus sp.*, izolyovanykh vid khvorykh na alkalgolnyy deliriy // Ukrainskyy biofarmatsevtichnyy zhurnal. – 2010. – №4. – С. 14–18./

Пилькевич Н.Б. Антилизоцимная активность бактерий – этиологических агентов сепсиса новорожденных. [Электронный ресурс]. (http://www.rusnauka.com/SND/Medecine/15_pil_kevich.doc.htm) /Pilkevich N.B. Antilizotsimnaya aktivnost' bakteriy – etiologicheskikh agentov sepsisa novorozhdennykh. [Elektronnyy resurs]. (http://www.rusnauka.com/SND/Medecine/15_pil_kevich.doc.htm)

Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-бактериологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». [Электронный ресурс]. (<http://lawru.info/legal2/se4/pravo4231/index.htm>) /Prykaz MZ SSSR ot 22/04/1985 №535 «Ob unifikatsii mikribiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-bakteriologicheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniy». [Elektronnyy resurs]. (<http://lawru.info/legal2/se4/pravo4231/index.htm>)

Четвертнова Г.А. Факторы, способствующие персистенции микрофлоры в полости рта при аномалии положения зубов. [Электронный ресурс]. (<http://www.volgostom.ru/stati-nauchnie-eksperimentalnie/faktori-sposobstvuiuschie-persistentsii-mikroflori-v-polosti-rta-pri-anomalii-polozheniya-zubov>) /Chetvertnova G.A. Faktory, sposobstvuyushchiye persistentsii mikroflory v polosti rta pri anomalii polozheniya zubov. [Elektronnyy resurs]. (<http://www.volgostom.ru/stati-nauchnie-eksperimentalnie/faktori-sposobstvuiuschie-persistentsii-mikroflori-v-polosti-rta-pri-anomalii-polozheniya-zubov>)

Представлено: Г.М.Большакова / Presented by: G.M.Bol'shakova

Рецензент: О.І.Віннікова / Reviewer: O.I.Vinnikova

Подано до редакції / Received: 05.04.2012